

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/53, 9/02, 15/63, 1/21, C12Q 1/26	A1	(11) 国際公開番号 WO99/33997
		(43) 国際公開日 1999年7月8日(08.07.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05864		(81) 指定国 AU, CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) 国際出願日 1998年12月24日(24.12.98)		添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示
(30) 連先権データ 特願平9/361022 1997年12月26日(26.12.97) JP		
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) キッローマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION)[JP/JP] 〒278-8601 千葉県野田市野田339番地 Chiba, (JP)		
(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 服部憲晃(HATTORI, Noriaki)[JP/JP] 村上成治(MURAKAMI, Seiji)[JP/JP] 〒278-8601 千葉県野田市野田339番地 キッローマン株式会社内 Chiba, (JP)		
(74) 代理人 弁理士 平木祐輔、外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)		

(54) Title: LUCIFERASE AND METHOD FOR ASSAYING INTRACELLULAR ATP BY USING THE SAME

(54) 発明の名称 ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内ATPの測定法

(57) Abstract

A luciferase tolerant to surfactants; and a method for assaying intracellular ATP which comprises the first step of extracting ATP from a cell-containing sample in the presence of a surfactant, the second step of adding a luciferase-containing luminescent reagent to the ATP extract thus inducing luminescence and the third step of detecting the luminescence dose, characterized by using the luciferase tolerant to surfactants.

BEST AVAILABLE COPY

(57)要約

界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ、及び細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にATPを抽出する第1工程、該ATP抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第2工程、および該発光量を検出する第3工程を含む細胞内ATPの測定法において、ルシフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内ATPの測定法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロ伐キア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レント	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 天国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スウェーデン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC キナコ	TG トーゴー
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドバ	TJ クジキスタン
BF ブルガリア・ファン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BI ベナン	GR ギリシャ	英帝国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	ML マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG クンダナ
CA カナダ	ID インドネシア	MR ソーリタニア	US 美国
CF カンボジア	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジエール	YU ユーゴースラビア
CI コートジボアール	IS イスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NZ ニュージーランド	
CO ケニア	KD ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG ケルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK ダンマーク	KZ カザフスタン	SD スーダン	
EE エストニア	LC セントルンジ	SE スウェーデン	

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

明 細 奢

ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内ATPの測定法

技術分野

この発明は、界面活性耐性を有する新規ルシフェラーゼおよびそれを用いる細胞内ATPの測定法に関する。

背景技術

食品衛生、バイオ、臨床検査、医学、超純水、環境などの分野では、試料中の細胞の有無や細胞数の計測等を目的として、細胞内ATPの測定が日常的に行なわれている。細胞内ATPの測定法においては、細胞を含む試料に、界面活性剤を有効成分とするATP抽出試薬を添加して、細胞内ATPを細胞外に抽出した後、ルシフェラーゼを含む発光試薬を試料に添加し、生じる発光の発光量を測定する方法が一般的である。

ルシフェラーゼは、ATPおよびマグネシウムイオンの存在下で、基質であるルシフェリンの発光反応を触媒する酵素である。細胞内ATPの測定法におけるルシフェラーゼとしては、例えばホタル（ゲンジボタル、ヘイケボタル、アメリカホタル、ロシアホタル等）を由来とするものが用いられている。

細胞内ATPの抽出は、細胞を含む試料に、ATP抽出試薬を添加して攪拌することにより成し遂げられる。充分な抽出能力を発現させるためには、試料と抽出試薬を混合したときの混合液に対し、界面活性剤の濃度が0.05%以上になるように添加することが望ましい。しかし、界面活性剤の濃度が0.05%以上である場合、生物発光によりATP濃度を測定する工程で酵素反応を著しく阻害するため、測定感度および精度が大きく低下する。これは、高濃度の界面活性剤によりルシフェラーゼの活性が低下することが原因であると考えられている。例えば、アメリカホタルのルシフェラーゼは、0.1%の塩化ベンザルコニウムの存在下では、その活性が約20%にまで低下する（第1表参照）。

一方、界面活性剤の濃度が低いと生物発光反応の阻害を小さくできるが、AT

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

Pの抽出効率が不十分となる。

界面活性剤による発光反応の阻害を抑制する方法として、サイクロデキストリンまたはその誘導体を使用する方法は公知である（特表平6-504200号）。また、細胞を含む試料を界面活性剤と接触させて細胞内ATPを抽出し、次いでルシフェリールシフェラーゼ生物発光反応法により該ATPを測定する方法において、ATP抽出後の試料をサイクロデキストリンと接触させた後に生物発光反応法を適用することを特徴とする細胞内ATPの測定方法も公知である（特開平7-203995号公報）。

しかしながら、ルシフェラーゼに注目して、界面活性剤による生物発光反応の阻害を抑制しようとした試みはなかった。

従って、発明の目的は、界面活性剤が高濃度に存在する場合でも活性が低下しない、界面活性剤に耐性を有する新規なルシフェラーゼを提供することにある。また、本発明の目的は、界面活性剤を使用して細胞内ATPを抽出し、ついで該細胞内ATPをルシフェラーゼを用いる生物発光反応法により測定する方法において、界面活性剤による生物発光反応の阻害を抑制することができ、且つ細胞内ATPの抽出効率を低下させることがない方法を提供することにある。

なお、ここでいう「抑制」とは、界面活性剤による生物発光反応の阻害を有意に低減すること、及び該阻害を完全に排除することを意味する。

発明の開示

本発明は、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼである。

上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼとしては、野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、490位のアミノ酸、またはゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸を、グルタミン酸以外の他のアミノ酸、例えばリジンに置換したものが挙げられる。

また、上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼとしては、以下の(a)又は(b)からなるポリペプチド

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) (a)のポリペプチドにおいて1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド、あるいは以下の(a)又は(b)からなるポリペプチド

(a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) (a)のポリペプチドにおいて1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するタンパク質、

が挙げられる。

さらに、本発明は上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼをコードするルシフェラーゼ遺伝子である。

さらに、本発明は上記界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼをコードするルシフェラーゼ遺伝子を含む組換ベクターである。

さらに、本発明は上記組換ベクターを含む形質転換体である。

さらに、本発明は上記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを採取することを特徴とする該ルシフェラーゼの製造法である。

さらに、本発明は細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にATPを抽出する第1工程、該ATP抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第2工程、および該発光量を検出する第3工程を含む細胞内ATPの測定法において、ルシフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内ATPの測定法である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、平成9年特許願第361022号の明細書及び／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

第1図は変異型ルシフェラーゼHIKの遺伝子の作製図を示す図であり、第2図は天然型ルシフェラーゼの発光量の経時変化を示す図であり、第3図は変異型ルシフェラーゼの塩化ベンザルコニウムに対する耐性比較を示す図であり、第4図は変異型ルシフェラーゼの塩化ベンゼトニウムに対する耐性比較を示す図である。

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

発明の詳細な説明

以下、本発明について詳述する。

(界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼについて)

本発明の界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼについて説明する。

「界面活性剤に耐性を有する」とは、次のいずれかの性質を有するものをいう。

(1) 従来公知のルシフェラーゼと比較した場合に、界面活性剤存在下での初発の発光量が増大するものをいう。ここでいう「比較」とは、例えば、公知のルシフェラーゼのアミノ酸配列に変異を導入して本発明のルシフェラーゼを作製する場合であれば、変異導入前のルシフェラーゼの発光量と、変異導入後のルシフェラーゼの発光量との比較を意味する。

(2) 従来公知のルシフェラーゼと比較した場合に、界面活性剤存在下での活性の低下が緩やかであることをいう。

(3) 0.4%の界面活性剤存在下で、85%以上の残存活性を有することをいう。

以後、「界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ」を、「界面活性剤耐性ルシフェラーゼ」と表記する。

「活性」とは、生物発光反応の触媒活性を意味する。また、本発明でいう「界面活性剤」とは、細胞内ATPの測定系に使用されうるものであればいずれでもよく、例えば、アニオン系界面活性剤、カチオン系界面活性剤、ツイッターイオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤等が挙げられ、さらに具体的には、塩化ベンザルコニウムあるいは塩化ベンゼトニウム等の第4級アンモニウム塩を主成分とする試薬が挙げられる。

本発明のルシフェラーゼは、発光性生物の発光器官等から調製することにより得られる。発光性生物としては、発光性昆虫、発光性細菌等が挙げられる。発光性昆虫としては、甲虫目(cleoptera)に属するもの、例えばホタル科やコメツキムシ科の昆虫、具体的には、ゲンジボタル、ヘイケボタル、アメリカホタル、ロシアホタル、ヒカリコメツキムシツチボタル、鉄道虫等が挙げられる。また、本発明のルシフェラーゼは、上記の発光生物からルシフェラーゼ遺伝子をクローニングし、該遺伝子を適当なベクター宿主系を用いて発現させることにより得ら

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

れる。

さらに、本発明のルシフェラーゼは、従来公知のルシフェラーゼのアミノ酸配列に付加、欠失、置換等の変異を導入することにより得られる。アミノ酸配列に変異を導入する方法としては、公知の遺伝子工学的手法を使用することができる。その場合、まず、上記の発光性生物を由来とするルシフェラーゼ遺伝子や既知のルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列に遺伝子工学的手法により付加、欠失、置換等の変異を導入して変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築する。ついで、該変異型遺伝子を適当なベクター宿主系に導入して組み換え微生物を作製する。さらに該組み換え微生物の中から、本発明のルシフェラーゼを生産するものをスクリーニングし、それを培地に培養し、得られる培養物からルシフェラーゼを採取すればよい。

以後、アミノ酸配列に変異を導入することにより得られた界面活性剤耐性ルシフェラーゼを、「変異型ルシフェラーゼ」と表記することとする。

変異型ルシフェラーゼとしては、例えば、野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸が、グルタミン酸以外のアミノ酸に置換されたルシフェラーゼが挙げられる。グルタミン酸以外のアミノ酸としては、例えば塩基性アミノ酸、具体的には、リジン、アルギニン、ヒスチジン等が挙げられる。「ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸」とは、確定したルシフェラーゼのアミノ酸配列をゲンジボタルまたはヘイケボタルルシフェラーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、ゲンジボタルまたはヘイケボタルルシフェラーゼの490位のアミノ酸に対応するアミノ酸を意味するものである。

なお、ゲンジボタルまたはヘイケボタルのルシフェラーゼでは、490位のアミノ酸はグルタミン酸である。また、アメリカホタルルシフェラーゼにおいて、「ゲンジボタルまたはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸」とは、487位のグルタミン酸である。

さらに具体的には、変異型ルシフェラーゼとは、配列番号1または2で表されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列のうちの1若しくは複数のアミノ酸が付加、

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

欠失若しくは置換されたアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

[遺伝子工学的手法を用いて変異型ルシフェラーゼを得る方法]

以下に、遺伝子工学的手法を用いて変異型ルシフェラーゼを得る方法について説明する。

変異型ルシフェラーゼは、既知のルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列に付加、欠失、置換等の変異を導入して変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築し、該遺伝子を適当なベクター宿主系により発現させることにより得られる。

既知のルシフェラーゼ遺伝子としては、特に限定されないが、例えば、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、具体的には、野生型ヘイケボタルルシフェラーゼ遺伝子（特開平2-171189号公報に記載）、耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ遺伝子（特開平5-244942号公報に記載）等が挙げられる。

i) ルシフェラーゼ遺伝子に変異を導入する方法としては、該遺伝子と変異原となる薬剤、具体的にはヒドロキシリアルアミン、亜硝酸、亜硫酸、5-ブロモウラシル等を接触させる方法を挙げることができる。この他、紫外線照射法、カセッタ変異法、PCR法を用いた部位特異的変異導入法等の方法を広く用いることができる。更には、化学合成したDNAをアニーリングして所望の部位に変異を有する変異型ルシフェラーゼ遺伝子を構築することも可能である。

ii) 次いで、変異型ルシフェラーゼ遺伝子を、プロモーター配列、マーカー遺伝子、複製起点等を有するベクターDNAに挿入して組み換え体プラスミドを得る。ベクターDNAは、宿主細胞で複製可能なものであれば如何なるものでもよく、例えば、プラスミドDNA、バクテリオファージDNA等が挙げられる。宿主細胞が大腸菌である場合のベクターDNAとしては、プラスミドpUC119（宝酒造社製）、pBluescript SK+(Stratagene社製)、pMAL-C2 (NBW England Labs社製)、pGBX-5X-1 (ファルマシア社製)、pXa1 (ベーリンガー社製)、pMA56 (G. Ammerer, Meth. Enzymol., 101, 192, 1983) 等が使用できる。

iii) 次いで、上記の組み換え体プラスミドを用いて適当な宿主細胞を形質転換又は形質導入し、変異型ルシフェラーゼの生産能を有する組み換え微生物をスクリーニングする。

宿主細胞としては、真核細胞及び原核細胞のいずれをも使用できる。真核細胞

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

としては動物、植物、昆虫、酵母等の細胞が、原核細胞としては大腸菌、枯草菌、放線菌等が挙げられる。動物細胞としては、CHO、COS、HeLa細胞及びミエローマ細胞系統の細胞が、原核細胞としては、エッシェリシア属に属する微生物、例えば大腸菌JM101(ATCC 33876)、JM109(宝酒造社製)、XL1-Blue(Stratagene社製)、HB101(ATCC33694)等が使用できる。

本発明においては、形質転換は、例えば、D.M.Morrisonの方法(Meth. Enzymol., 68, 326-331, 1979)等により、形質導入は、例えば、B.Hahnの方法(Meth. Enzymol., 68, 299-309, 1979)等により行うことができる。

組み換え微生物より組み換え体DNAを精製する方法としては、例えば、P.Gerryの方法(J.Bacteriology, 116, 1064-1066, 1973)、D.B.Clewellの方法(J.Bacteriology, 110, 667-676, 1972)等を用いることができる。又、組み換え体DNAに挿入された遺伝子の塩基配列の決定は、例えば、Maxam-Gilbert法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560-564, 1977)、Dideoxy法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467, 1977)等により行うことができる。

iv) 上記の方法により得られた組み換え微生物を培地中で培養することにより、本発明の変異型ルシフェラーゼを生産することができる。

宿主細胞が大腸菌である場合、組み換え大腸菌を固体培養法で培養してもよいが、液体培養法により培養するのが好ましい。培地としては、例えば、酵母エキス、トリプトン、ペプトン、肉エキス、コーンスティープリカーアリイは大豆もしくは小麦ふすま浸出液等の1種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸1カリウム、リン酸2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄、あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。なお、培地の初発pHは、pH 7~9に調製するのが適当である。また培養は30~42°C、好ましくは37°C前後で3~24時間、好ましくは5~8時間、通気攪拌深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。

組み換え大腸菌の培養終了後、培養物より変異型ルシフェラーゼを採取するには、通常の酵素採取手段を用いることができる。すなわち、培養物を遠心分離して菌体を得た後、リゾチーム等の酵素を用いた溶菌処理、超音波破碎処理、磨碎

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

処理等により菌体を破壊し、融合タンパク質を菌体外に排出させる。次いで、ろ過又は遠心分離等を用いて不溶物を除去することにより、変異型ルシフェラーゼを含有する粗酵素液を得ることができる。

本発明では、上記の粗酵素液をそのままタンパク質標品としてもよいが、通常のタンパク質精製法を用いて、更に純度を高めてもよい。具体的には、硫酸塩析法、有機溶媒沈澱法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、電気泳動法等を、単独又は適宜組み合わせて用いることができる。

本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼを使用することにより、細胞内ATPの抽出工程において、界面活性剤を高濃度に添加することが可能となる。

[本発明の細胞内ATPの測定法]

以下に、本発明の細胞内ATPの測定法について説明する。

i) まず、細胞を含む試料に、界面活性剤を有効成分とするATP抽出試薬を添加して、細胞内ATPを細胞外に抽出する。細胞とは、動物、植物、微生物（例えば、酵母、カビ、キノコ、細菌、放線菌、単細胞藻類、ウイルス、原生動物等）等を由来とする細胞を意味する。

試料とは、上記の細胞を含むものであれば特に限定されないが、例えば、飲食物、医薬、化粧品、海水、河川水、工業用水、下水、土壤、尿、糞便、血液、喀痰、膿汁、上記細胞の培養物等が挙げられる。また、上記の試料を、適当な溶媒（例えば、蒸留水、生理的食塩水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等）に懸濁した溶液を試料としてもよい。検体液が固形分を含む場合には、該検体液を適当な溶媒に懸濁するか、ミキサーなどでホモジナイズすれば溶液状のものと同様に扱うことができる。

また、上記溶液状の試料を、親水性または疎水性の濾過膜で濾過して細胞を捕捉した後に該濾過膜を試料としてもよい。細胞を捕捉した濾過膜を試料とする場合、親水性濾過膜としては、例えば親水性ポリテトラフルオロエチレン、親水性ポリビニリデンフルオライド、親水性ポリアミド、アセチルセルロース、ニトロセルローズ等を材料とするフィルム状又はシート状のものが使用できる。また、疎水性濾過膜としては、例えばPVDF（ポリビニリデンフルオライド）、PT

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

F E (ポリトラフルオロエチレン)、P E (ポリエチレン) 等を材料とするものが使用できる。

界面活性剤としては、例えば、アニオン系界面活性剤、カチオン系界面活性剤、ツイッターイオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤等が挙げられる。アニオン系界面活性剤としては、例えばドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ラウリル硫酸カリウム、モノラウロイルリン酸ナトリウム、アルキルベンスルホン酸ナトリウムがあげられる。カチオン系界面活性剤としては、例えば塩化ベンザルコニウム (BAC)、塩化ベンゼトニウム (BZC)、塩化セチルピリジニウム、臭化セチルトリメチルアノニウム、塩化ミリスチルジメチルベンジルアンモニウムがあげられる。また、ツイッターイオン系界面活性剤としては、例えばTwittergent Detergent 3-08, 3-10, 3-12, 3-14, 3-16、Tegoがあげられる。さらに非イオン性界面活性剤、例えば、Tween 20, 60, 80、Span 60, 80、Triton X-45, x-100、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレンラウリルエーテルがあげられる。

界面活性剤の濃度は、充分なATP抽出能力を発現させる濃度であればいずれでもよいが、試料とATP抽出試薬を混合した時の混合液に対し、界面活性剤の濃度が好ましくは0.05%以上になるように添加する。

試料とATP抽出試薬との反応条件は、室温あるいは加温しつつ接触させればよい。

ii) ATP抽出後の試料に界面活性剤耐性ルシフェラーゼを含む生物発光試薬を添加して発光を生じさせ、生じた発光を検出する。

界面活性剤耐性ルシフェラーゼがホタル由来のものである場合、生物発光試薬とは、例えば以下の(イ)～(ハ)の成分を含む試薬である。

- (イ) 界面活性剤耐性ルシフェラーゼ
- (ロ) ルシフェリン
- (ハ) マグネシウムイオンまたは他の金属イオン

なお、発光試薬には上記の成分のほか、pH調製や保存性向上に関する物質を添加してもよい。そのような物質としては、例えば、EDTA 2Na、ジチオスレイトル、硫酸アンモニウム、シュークロース、2-メルカプトエタノール、HEPES

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

、Tricine、Tris、等が挙げられる。

iii) 生物発光試薬の添加により生じた光の発光量は、ルミノメーター、例えばキッコーマン社製ルミテスターK-100、アロカ社製ルミネッセンスリーダーBLR-201（改良型）、ベルトールド社製Lumat LB9501等により測定することができる。また、細胞を捕捉した濾過膜を試料とする場合、生物発光画像解析システム装置、例えばARGUS-50/CL〔テーパーファイバー付：浜松ホトニクス（株）社製〕を用いて濾過膜上の輝点を撮像することにより、細胞数を測定することが可能である。

以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例にそのその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕 各種ホタル由来の天然型ルシフェラーゼの界面活性剤耐性
(各種ホタル由来の野生型ルシフェラーゼの調製法)

以下の方法に準じて、ゲンジおよびハイケボタル由来のルシフェラーゼを調製した。すなわち、25mMトリス（ヒドロキシ）アミノメタン-塩酸緩衝液に、1mMエチレンジアミン4酢酸2ナトリウム及び2mMフェニルメチルスルフォニルフルオリドを添加し、更に硫酸アンモニウムを10%飽和となる如く添加して得た混液（pH7.8）に、各種ホタルの尾部を添加してヒスコトロン〔（株）日音医理器械製作所製〕を用いて破壊した。得られた溶液を12,000r.p.mで20分間遠心分離し、上清を以下の精製工程の出発原料とした。精製は、硫酸アンモニウム塩析、ウルトロゲル（Ultrogel）AcA34（LKB社製）カラム、ヒドロキシアバタイトHPLC（東洋薬業社製、TSKgel HA-1000）カラムの工程により行い、最終的に電気泳動的に单一な標品を得た。なお、アメリカホタル由来のルシフェラーゼは市販品（Sigma社製、L-9506）を使用した。

（ルシフェラーゼの活性測定法）

ルシフェラーゼ標品を酵素希釈液（1 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール, 1% BSA, 50 mM HEPES, (pH 7.5)）にて適宜希釈し、その100μlに100μlの基質溶液（1.4 mMルシフェリン, 40 mM ATP, 300 mM MgSO₄·7H₂O, 50 mM HEPES, (pH 7.5)）を添加した。発光量の測定は、BLR-201 Luminescence reader（アロカ社製）を用いて以下の設定条件で測定を行った。

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

測定レンジ : x100

表示数値 : x1000

測定温度 : 30°C

測定時間 : 20秒間

この条件での測定値が1 Kcountの時の活性値を1 MLU (メライトユニット) /mlとした。

(界面活性剤耐性の測定法)

各種ホタル由来ルシフェラーゼ標品を0.5 MLU/mlの濃度になるよう酵素希釈液 (1 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール, 5%グリセロール, 50 mM HEPES (pH 7.5)) を用いて調整し、酵素標品とした。

100 μl の基質溶液 (4 mM ATP, 0.4 mM ルシフェリン, 10 mM 硫酸マグネシウム, 50 mM HEPES (pH 7.5)) に50 μl の0.4%塩化ベンザルコニウム (25 mM Tricine (pH 7.75)) を添加し、さらに50 μl の酵素標品を添加して、5秒攪拌した後にBerthold Lumat LB-9501にて1秒ごとに1分間の発光量を経時的に測定した。

その結果を図2に示す。図中縦軸には、0.4%塩化ベンザルコニウムの代わりに25 mM Tricine (pH 7.75)を使用したときの初発発光量を100%とした際の発光量の相対比をプロットしている。

この結果において、アメリカホタルルシフェラーゼは初発の発光量が低く、また発光量が急激に減衰しているのがわかる。これはアメリカホタルルシフェラーゼの界面活性剤耐性が低いためであり、感度の低下および測定値の精度の低下を招く。これに対し、ゲンジボタルルシフェラーゼはアメリカホタルルシフェラーゼと比べ初発の発光量が高かった。すなわち、ゲンジボタルルシフェラーゼはアメリカホタルルシフェラーゼより界面活性剤耐性が優れていることが示された。さらにヘイケボタルルシフェラーゼはゲンジボタルルシフェラーゼより初発の発光量が高く、発光の減衰も緩やかであったことから、優れた耐性を示すことが明らかになった。この結果より、ルシフェラーゼの界面活性剤に対する耐性度は、起源とするホタルの種類により異なっていることが示唆された。

(実施例2) 変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの作製

以下の方法により、ヘイケボタルを由来とする2種類の変異型ルシフェラーゼ

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

(「HLK」及び「HIK」と命名)を調製した。

(変異型ルシフェラーゼHLKをコードする遺伝子の作製)

PCRを用いた部位特異的変異法により、変異型ルシフェラーゼ遺伝子を作成した。PCR反応の録型として特開平5-244942号公報記載のプラスミドpHLf7-217Leu(プラスミドpUC119に、217番目のAlaに相当する遺伝子部分がLeuをコードする遺伝子に置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼの遺伝子が挿入された組み換え体プラスミド)を使用した。なお、該プラスミドが導入された大腸菌JM101株は、大腸菌(E. coli) JM101(pHLf7-217Leu)と命名され、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)にFERM BP-3840(寄託日:平成4年(1992)4月22日)として寄託されている。

PCR反応のプライマーとして配列番号1、2で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを、またDNA polymeraseとしてのKOD dash polymerase(TOYOBO社製)を使用した。KOD dash polymeraseに付属の実施例に準じてGeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer社製)を用い、94°Cで30秒、50°Cで2秒、74°Cで3分のサイクルを30サイクル繰り返し、PCR反応を行った。生じたPCR産物を常法に従ってLigationを行い、環状の組み換え体プラスミドpHLfLKを得た。

pHLfLKに含まれる変異型ルシフェラーゼ遺伝子のシークエンシングを行った。ダイプライマータックシークエンシングキット(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、ABI 373A DNAシークエンサー(アプライドバイオシステムズ社製)で泳動解析を行った。このようにして得られた変異型ルシフェラーゼ遺伝子の全塩基配列を配列番号3に、また、該遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号4に示す。変異型ルシフェラーゼ遺伝子では、野型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のアラニンに相当する遺伝子部分がロイシンに、また490番目のグルタミン酸に相当する遺伝子部分がリジンをコードする遺伝子に置換されていた。

pHLfLKを導入した大腸菌JM109株を、大腸菌(E. coli) JM109(pHLfLK)と命名した(図1参照)。大腸菌(E. coli) JM109(pHLfLK)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6147(寄託日:平成9年(1997)10月16日)として寄託されている。

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

配列番号4に示すポリペプチドを、変異型ルシフェラーゼHLKと命名した。

(変異型ルシフェラーゼHIKをコードする遺伝子の作製)

特開平5-244942号公報記載のプラスミドpHLf7-217Ile (プラスミドpUC119に、217番目のAlaに相当する遺伝子部分がIleをコードする遺伝子に置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼの遺伝子が挿入された組み換え体プラスミド) を用いて変異型ルシフェラーゼ遺伝子を作成した。該プラスミドによる形質転換株は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-3841 (寄託日: 平成4年(1992)4月22日) として寄託されている。

pHLfLKをEcoRVおよびNarIで切断し得られた約560bpの断片をアガロースゲル電気泳動により取得し、同じ制限酵素で処理したpHLf7-217Ileに挿入した。

このようにして得られた組み換え体プラスミドをpHLfIKと命名し、該プラスミドを導入した大腸菌JM109株を大腸菌(E. coli) JM109(pHLfIK)と命名した。大腸菌(E. coli) JM109(pHLfIK)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6146 (寄託日: 平成9年(1997)10月16日) として寄託されている。

pHLfIKに含まれる変異型ルシフェラーゼ遺伝子の全塩基配列を配列番号5に、また、該遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号6に示す。変異型ルシフェラーゼ遺伝子では、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のアラニンに相当する遺伝子部分がイソロイシンに、また490番目のグルタミン酸に相当する遺伝子部分がリジンをコードする遺伝子に置換されていた(図1参照)。

配列番号6に示すポリペプチドを、変異型ルシフェラーゼHIKと命名した。

[実施例3] 変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの調製

大腸菌(E. coli) JM109(pHLfLK)及び大腸菌(E. coli) JM109(pHLfIK)を、それぞれアンピシリンを含むLB培地(バクトリプトン1% (W/V)、酵母エキス0.5% (W/V)、NaCl 0.5% (W/V)、アンピシリン(50μg/ml)、1.4% (W/V) 寒天)に接種し、37°Cで18時間培養を行なった。得られた培養液を、8000 r.p.m.で10分間の遠心分離し、沈殿した菌体を0.1 M リン酸カリウム緩衝液(pH7.8)、0.1 M 硫酸アンモニウム、1 mM EDTA)に懸濁した後、超音波破碎した。

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

次いで、12000 r.p.m.で10分間遠心分離を行ない、粗酵素液を得た。得られた粗酵素液を前述した精製法により、電気泳動的に单一にまで精製した。

[実施例4] 変異型ルシフェラーゼHLKおよびHIKの界面活性剤耐性
(発光の経時変化)

変異型ルシフェラーゼと公知のルシフェラーゼとの界面活性剤耐性を比較するため、前述した界面活性剤耐性の測定法に準じて発光量の経時変化を測定した。界面活性剤として、0.4%塩化ベンザルコニウム(25mM Tricine(pH 7.75))を使用した結果を図3に、0.8%塩化ベンゼトニウム(25mM Tricine(pH 7.75))を使用した結果を図4に示す。

図中「ヘイケI変異体」は、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のAlaがIleに置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ(特開平5-244942号公報)であり、「ヘイケL変異体」は、野性型ヘイケボタルルシフェラーゼの217番目のAlaがLeuに置換された耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼ(特開平5-244942号)である。また、「HIK」はヘイケI変異体の490番目のGluをlysに置換した変異体であり、実施例3で調製した変異型ルシフェラーゼHIKである。「HLK」はヘイケL変異体の490番目のGluをlysに置換した変異体であり、実施例3で調製した変異型ルシフェラーゼHLKである。

図3に示した塩化ベンザルコニウムの結果において、HIKとヘイケI変異体とを比較するとHIKのほうが発光の減衰が穢やかであることがわかる。また、HLKとヘイケL変異体とを比較すると、HLKのほうが初発発光量が20%程度向上しており、また発光の減衰が穢やかであることがわかる。このことより490番目のアミノ酸の置換により界面活性剤耐性が向上していることが示された。

図4に示した塩化ベンゼトニウムの結果において、HIKとヘイケI変異体とを比較すると、HIKのほうが発光の減衰が穢やかであることがわかる。また、HLKとヘイケL変異体とを比較すると、HLKのほうが発光の減衰が穢やかであることがわかる。このことより490番目のアミノ酸の置換により界面活性剤耐性が向上していることが示された。

(発光率の比較)

発光の経時変化を測定する際に使用した酵素溶液、基質溶液および塩化ベンザ

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

ルコニウムを用い、実際の発光測定条件下での測定値への影響を調べた。Berthold Lumat LB-9501を用い、待ち時間5秒、測定時間3秒の測定条件で求めた発光量を第1表に示す。なお、0.4%塩化ベンザルコニウムの代わりに25 mM Tricine (pH 7.75)を使用したときの発光量をコントロールとし、0.4%塩化ベンザルコニウム存在時の発光量をコントロール値で割った値を発光率(残存活性)として算出した。

第1表 各種ルシフェラーゼの発光率

ルシフェラーゼの種類	発光量 (RLU)		発光率 (%)
	抽出試薬なし	抽出試薬あり	
アメリカボタルルシフェラーゼ	452563	97790	21.6
ゲンジボタルルシフェラーゼ	409406	167805	41.0
ハイケボタルルシフェラーゼ	425792	324724	76.3
ハイケ変異体	422269	341039	80.8
ハイケL変異体	423728	343634	81.1
HIK	386429	345159	89.3
HLK	390289	396764	101.7

アメリカボタルルシフェラーゼは発光率が21.6%と最も低く、感度が大幅に低下することが示唆された。これに対しゲンジボタルルシフェラーゼおよびハイケボタルルシフェラーゼの発光率はそれぞれ41.0%および76.3%であり、アメリカボタルルシフェラーゼと比較し感度低下の影響が少ないことがわかる。

一方、変異型ルシフェラーゼHIKおよびHLKの発光率はそれぞれ89.3%および101.7%であり、野性型のハイケボタルルシフェラーゼおよび耐熱性ハイケボタルルシフェラーゼの発光率を大きく上回った。中でもHLKの発光率はほぼ100%であり、界面活性剤の有無にかかわらず同じ発光量を得ることが出来る。すなわち界面活性剤を用いても感度低下を全く受けず、精度の高い測定が可能であることが示された。

(IC50の比較)

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

塩化ベンザルコニウムと各種ルシフェラーゼを10分間接触させ、活性の50%を失活させる塩化ベンザルコニウム濃度 (IC₅₀) を求めた。前述した濃度に調整したルシフェラーゼ溶液と0.01~0.1%までの塩化ベンザルコニウムを等量で混和し、10分間室温で放置した。その後、100 μl の基質溶液を添加して、Berthold Lumat LB-9501にて直ちに発光量を測定した。得られたIC₅₀を第2表にまとめた。

第2表 各種ルシフェラーゼの IC₅₀。

ルシフェラーゼの種類	IC ₅₀ (%)
アメリカホタルルシフェラーゼ	0.014
ケンジボタルルシフェラーゼ	0.016
ハイケボタルルシフェラーゼ	0.026
ハイケ変異体	0.028
ハイケL変異体	0.028
HIK	0.032
HLK	0.035

野性型ルシフェラーゼ3種のうちアメリカホタルルシフェラーゼは最も低いIC₅₀を示し、界面活性剤に対する耐性が最も劣っていることが示された。ハイケボタルルシフェラーゼは野性型の中で最も高いIC₅₀を示した。HLKおよびHIKは、野性型ハイケボタルルシフェラーゼおよび耐熱性ハイケボタルルシフェラーゼのIC₅₀を更に上回り、490番目のアミノ酸の置換により耐性が向上したことが示された。中でもHLKの IC₅₀はHIKを上回り、最も界面活性剤耐性が優れていることが示唆された。

[実施例5] (細胞内ATPの測定法)

次に、本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼを用いた細胞内ATPの測定法について説明する。

なお、従来法として、トリクロロ酢酸 (TCA)により細胞内ATPを抽出し、抽出されたATP量をルシフェリンールシフェラーゼ発光反応により測定する方法 (TC

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

A 抽出法) を採用した。TCA 抽出法はATP の抽出効率が非常に優れており、また、TCA を含む試料を 100 倍に希釈した後に発光を測定するので、TCA による発光反応の阻害も生じない。しかし、この希釈操作のため、TCA 抽出法は、操作が煩雑となり、また、測定感度の低下が起こるという問題がある。

1. 実験材料

(1) 使用した界面活性剤

界面活性剤として、塩化ベンザルコニウム (BAC、日本薬局法のオスバン液) を使用した。上記界面活性剤を 0.25 %濃度で25mM Tricine(pH 7.75) に溶解したもの、ATP抽出用試薬とした。

(2) 使用した微生物

Escherichia coli(ATCC 25922)、*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)、*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) および*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) の4 菌種を使用した。

(3) 試料の調製

従来法では、上記微生物を普通ブイヨン培地 (栄研化学(株) 製) で一晩 35 °Cで培養して得られた培養液の原液を試料とした。一方、本発明の方法では、該培養液の原液を滅菌水で100 倍希釈して得られた希釈液を試料とした。

(4) 使用したルシフェラーゼ

本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼとして、HIK 及びHLK を使用した。また、対照として公知のルシフェラーゼ種 (アメリカボタルルシフェラーゼ、ゲンジボタルルシフェラーゼ、ハイケボタルルシフェラーゼ、ハイケI変異体、ハイケI変異体) を使用した。

(5) 発光試薬

各種ルシフェラーゼを、0.15 mM ルシフェリン、6 mM EDTA、15 mM酢酸マグネシウム、0.2 mMジチオスレイトール、0.5 % BSA、25 mM HEPES(pH 7.75)の溶液に添加し、発光試薬として用いた。

添加するルシフェラーゼ量は、発光試薬100 μl に等量の 2×10^{-9} MのATP 標準液を添加した時の発光量が、発光試薬として「ルシフェラーゼ LU」(キッコーマン社製) に付属の発光試薬を用いた時と同じになるように調整した。

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

2. 細胞内ATPの測定法について

(1) 本発明の方法

試料 $100\mu\text{l}$ にATP抽出用試薬 $100\mu\text{l}$ を添加した。20秒間室温で放置した後、発光試薬 $100\mu\text{l}$ を添加し、直ちに発光量をBerthold社製Lumat LB-9501 を用いて測定した。

(2) 従来法

試料 $100\mu\text{l}$ に等量の10%のトリクロロ酢酸溶液を加えて1分間放置した。その抽出液に 9.8 ml の 25mM Tricine(pH 7.75)を添加してよく攪拌した。この試料 $100\mu\text{l}$ に $100\mu\text{l}$ の 25mM Tricine(pH 7.75)および「ルシフェール LU」(キッコーマン社製)に付属の発光試薬 $100\mu\text{l}$ を添加し、直ちに発光量をBerthold社製Lumat LB-9501 を用いて測定した。

3. 結果

結果を第3表及び第4表に示す。また、従来法(TCA抽出法)で得られた発光量を100%とした際に、各種ルシフェラーゼを用いた発光試薬で得られた発光量の相対比も表中に示した。

第3表 細胞内ATPの測定

測定法	E.coli ATCC 25922		S.aureus ATCC 25923	
	測定値 (RLU)	相対比 (%)	測定値 (RLU)	相対比 (%)
従来法 (TCA抽出法)	132794	(100.0)	130220	(100.0)
アリガトタルシフェラーゼ	153	(0.1)	163	(0.1)
ゲンジキタルシフェラーゼ	463	(0.3)	659	(0.5)
ハイキタルシフェラーゼ	76082	(57.3)	74019	(56.8)
ハイキ変異体	47655	(35.9)	50031	(38.4)
ハイキ変異体	46217	(34.8)	51243	(39.4)
HIK	97073	(73.1)	76533	(58.8)
HLK	87981	(66.3)	72182	(55.4)

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

第4表 細胞内ATPの測定

測定法	P.aeruginosa ATCC 27853		E.faecalis ATCC 29212	
	測定値 (RLU)	相対比 (%)	測定値 (RLU)	相対比 (%)
従来法 (TCA抽出法)	168141	(100.0)	12427	(100.0)
アメリカボタルルシフェラーゼ	553	(0.3)	113	(0.1)
ゲンジボタルルシフェラーゼ	1503	(0.9)	163	(1.3)
ヘイケボタルルシフェラーゼ	117096	(69.6)	8132	(65.4)
ヘイケI変異体	80455	(47.8)	4586	(36.9)
ヘイケL変異体	81069	(48.2)	4762	(38.3)
HIK	131134	(78.0)	7914	(63.7)
HLK	131815	(78.4)	7998	(64.4)

アメリカボタルルシフェラーゼを用いた発光試薬は全く発光せず、またゲンジボタルルシフェラーゼの場合も微弱な発光しか示さなかった。これは、ルシフェラーゼ自体が界面活性剤により失活してしまったためである。従って、これらのルシフェラーゼには、ATP抽出用試薬として本検討で用いたような高濃度の界面活性剤は使用出来ないことが示された。

一方、ヘイケボタルルシフェラーゼの場合、アメリカボタルルシフェラーゼやゲンジボタルルシフェラーゼと異なり、TCA抽出法の6～7割程度の発光が認められた。ヘイケボタルルシフェラーゼは、アメリカボタルルシフェラーゼやゲンジボタルルシフェラーゼより高い界面活性剤耐性を有することが示された。

耐熱性ヘイケボタルルシフェラーゼであるヘイケI変異体およびヘイケL変異体の場合、得られた発光量はTCA抽出法の4割前後であり、野性型のヘイケボタルルシフェラーゼの場合を大きく下回った。

ところで、本発明の界面活性剤耐性ルシフェラーゼ、すなわちHIK及びHLKの場合、得られた発光量は野性型ヘイケボタルルシフェラーゼ及び耐熱性ルシフェラーゼを上回るものであった。また、この場合の発光量は、TCA抽出法の6～8割であった。

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

HIK及びHLKは、ハイケI変異体およびハイケII変異体の490位のGluをLysに置換したものである。490位のアミノ酸への変異の導入により、界面活性剤に対する耐性が向上したものと考えられる。従って、HIK及びHLKは、本検討で用いたような高濃度のATP抽出用試薬に対しても感度低下は少ないので、これらを用いることにより、精度の高い測定が可能であることが示された。

産業上の利用可能性

本発明にかかる界面活性剤に耐性を有する新規なルシフェラーゼは、それを用いて細胞内ATPを測定することにより界面活性剤が高濃度に存在する場合でもルシフェラーゼ活性が低下することなく細胞内ATPを測定することができる。

本明細書で引用する全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

配列表フリーテキスト

配列番号1：合成DNA

配列番号2：合成DNA

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

請求の範囲

1. 界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ。
2. ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、ゲンジボタルもしくはヘイケボタルのルシフェラーゼの490位と同等位置のアミノ酸が、グルタミン酸以外の他のアミノ酸に置換されたものである、請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼ。
3. グルタミン酸以外の他のアミノ酸がリジンである、請求の範囲第2項記載のルシフェラーゼ。
4. 以下の(a)又は(b)からなる請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼ。
 - (a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - (b) (a)のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド
5. 以下の(a)又は(b)からなる請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼ。
 - (a) 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - (b) (a)のポリペプチドにおいて1若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド
6. 請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかの項記載のルシフェラーゼをコードする、ルシフェラーゼ遺伝子。
7. 請求の範囲第6項記載のルシフェラーゼ遺伝子を含む組換ベクター。
8. 請求の範囲第7項記載の組換ベクターを含む形質転換体。
9. 請求の範囲第8項記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からルシフェラーゼを採取することを特徴とするルシフェラーゼの製造法。
10. 細胞を含む試料から界面活性剤の存在下にATPを抽出する第1工程、該ATP抽出液にルシフェラーゼを含む発光試薬を添加して発光させる第2工程および該発光量を検出する第3工程を含む細胞内ATPの測定法において、ル

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

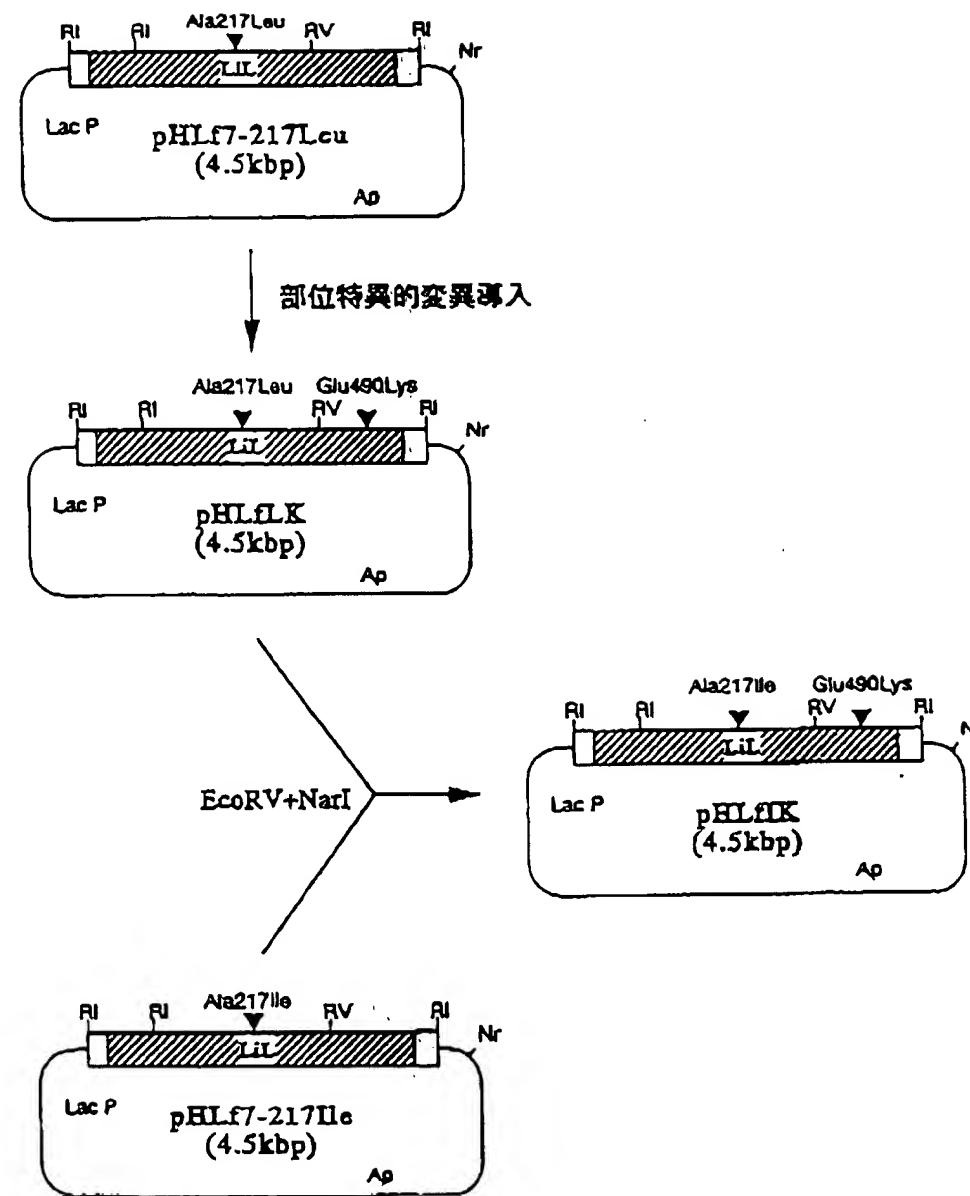
シフェラーゼとして、界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼを使用することを特徴とする細胞内ATPの測定法。

- 1 1. 界面活性剤に耐性を有するルシフェラーゼが請求項1乃至5のいずれかの項記載のルシフェラーゼであることを特徴とする、請求の範囲第10項記載の細胞内ATPの測定法。
- 1 2. 発光試薬の添加による発光が、0.01%以上の界面活性剤の存在下で行なわれる請求の範囲第10項または第11項に記載の細胞内ATPの測定法。
- 1 3. 界面活性剤がカチオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤、ツイッターアイオン系界面活性剤のいずれかである請求の範囲第10項、第11項または第12項に記載の細胞内ATPの測定法。

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

図 1

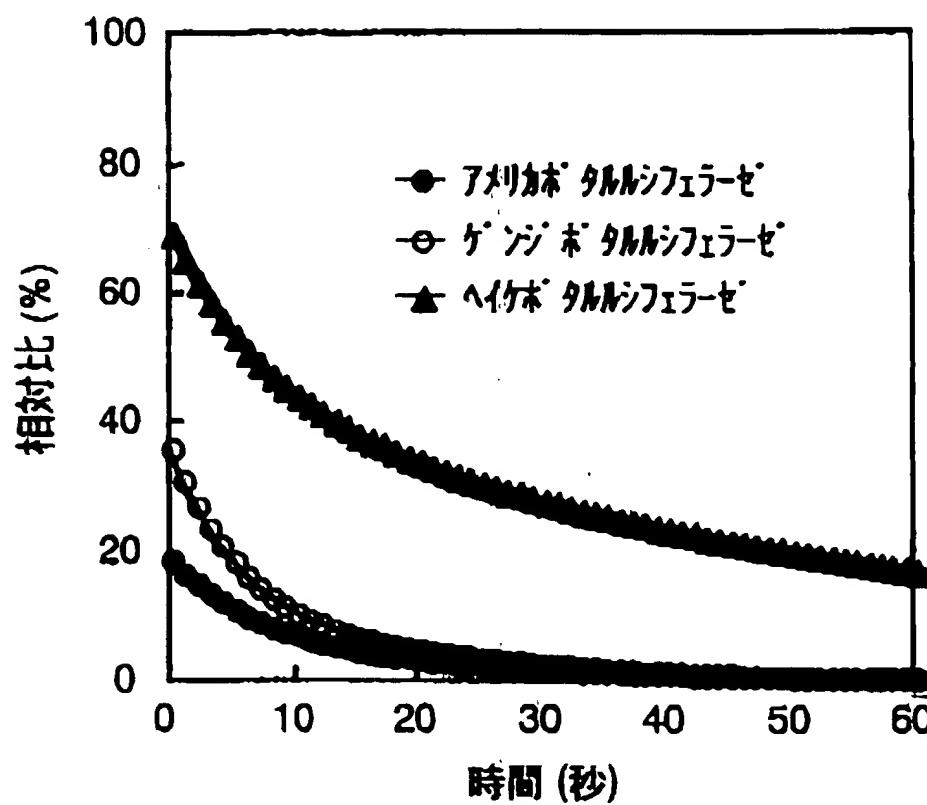


LiL: *Luciola lateralis* ルシフェラーゼ cDNA、Ap: β -ラクタマーゼ遺伝子、LacP: β -ガラクトシダーゼ プロモーター、RI: EcoRI、RV: EcoRV、Nr: NarI

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

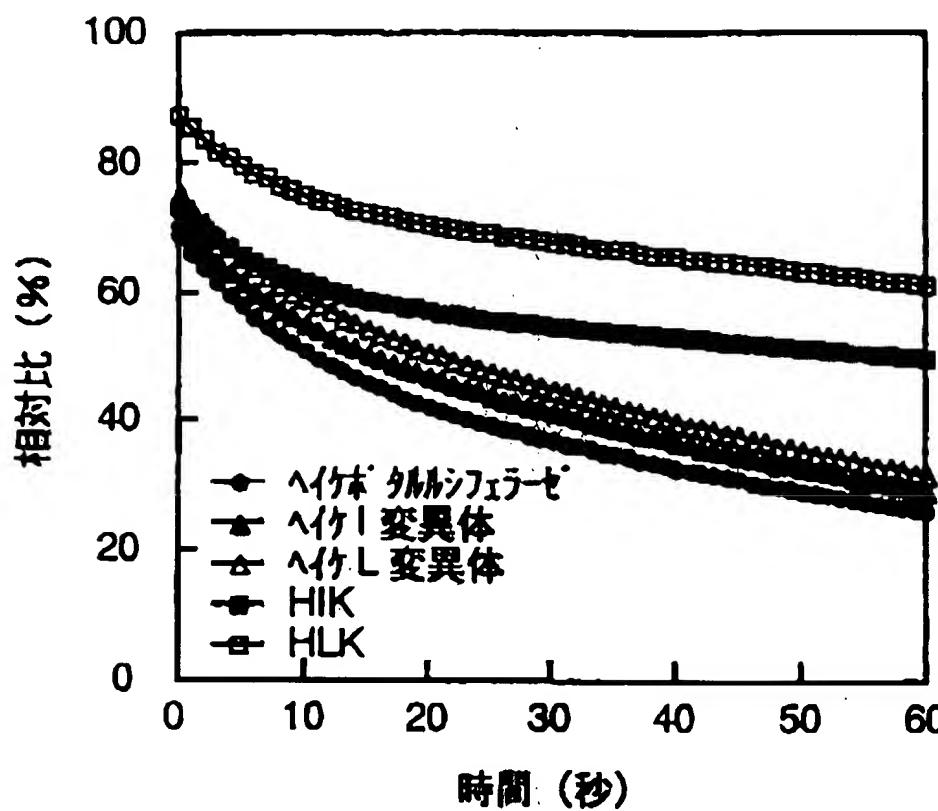
図 2



WO 99/33997

PCT/JP98/05864

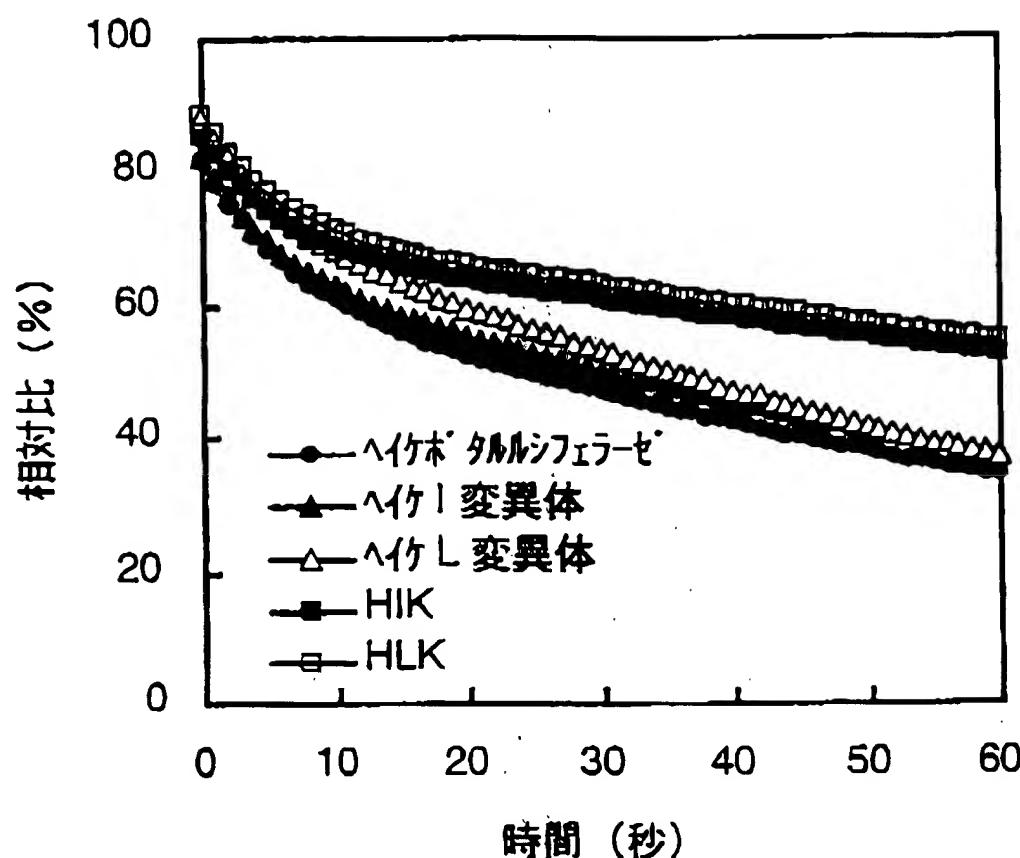
図 3



WO 99/33997

PCT/JP98/05864

図 4



WO 99/33997

PCT/JP98/05864

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> KIKKOMAN CORPORATION

<120> LUCIFERASE AND A METHOD FOR DETECTING INTRACELLULAR ATP
USING THE SAME

<130> P98-0634

<140>

<141>

<150> JP97/361022

<151> 1997-12-26

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

<400> 1

tgttgtactt aagaaaggaa aat

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

acagctcccg gaagctcacc agc

23

<210> 3

<211> 1644

<212> DNA

<213> Luciola lateralis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1644)

<400> 3

atg gaa aac atg gag aac gat gaa aat att gtg tat ggt cct gaa cca 48

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro

1

5

10

15

2 / 2 0

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

ttt tac cct att gaa gag gga tct gct gga gca caa ttg cgc aag tat 96
 Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr
 20 25 30

atg gat cga tat gca aaa ctt gga gca att gct ttt act aac gca ctt 144
 Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu
 35 40 45

acc ggt gtc gat tat acg tac gcc gaa tac tta gaa aaa tca tgc tgt 192
 Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys
 50 55 60

cta gga gag gct tta aag aat tat ggt ttg gtt gtt gat gga aga att 240
 Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
 65 70 75 80

gcg tta tgc agt gaa aac tgt gaa gaa ttc ttt att cct gta tta gcc 288
 Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala
 85 90 95

ggg tta ttt ata ggt gtc ggt gtg gct cca act aat gag att tac act 336
 Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr
 100 105 110

cta cgt gaa ttg gtt cac agt tta ggc atc tct aag cca aca att gta 384
 Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val
 115 120 125

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

ttt agt tct aaa aaa gga tta gat aaa gtt ata act gta caa aaa acg 432
 Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr
 130 135 140

gta act gct att aaa acc att gtt ata ttg gac agc aaa gtg gat tat 480
 Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
 145 150 155 160

aga ggt tat caa tcc atg gac aac ttt att aaa aaa aac act cca caa 528
 Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln
 165 170 175

ggc ttc aaa gga tca agt ttt aaa act gta gaa gtt aac cgc aaa gaa 576
 Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu
 180 185 190

caa gtt gct ctt ata atg aac tct tcg ggt tca acc ggt ttg cca aaa 624
 Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys
 195 200 205

ggc gtg caa ctt act cat gaa aat ttg gtc act aga ttt tct cac gct 672
 Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala
 210 215 220

aga gat cca att tat gga aac caa gtt tca cca ggc acg gct att ita 720
 Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu
 225 230 235 240

act gta gta cca ttc cat cat ggt ttt ggt atg ttt act act tta ggc 768

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly

245 250 255

tat cta act tgt ggt ttt cgt att gtc atg tta acg aaa ttt gac gaa 816

Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu

260 265 270

gag act ttt tta aaa aca ctg caa gat tac aaa tgt tca agc gtt att 864

Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile

275 280 285

ctt gta ccg act ttg ttt gca att ctt aat aga agt gaa tta ctc gat 912

Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp

290 295 300

aaa tat gat tta tca aat tta gtt gaa att gca tct ggc gga gca cct 960

Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro

305 310 315 320

tta tct aaa gaa att ggt gaa gct gtt gct aga cgt ttt aat tta ccg 1008

Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro

325 330 335

ggg gtt cgt caa ggc tat ggt tta aca gaa aca acc tct gca att att 1056

Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile

340 345 350

atc aca ccg gaa ggc gat gat aaa cca ggt gct tct ggc aaa gtt gtg 1104

Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

355

360

365

cca tta ttt aaa gca aaa gtt atc gat ctt gat act aaa aaa act ttg 1152
Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu

370

375

380

ggc ccg aac aga cgt gga gaa gtt tgt gta aag ggt cct atg ctt atg 1200
Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
385 390 395 400

aaa ggt tat gta gat aat cca gaa gca aca aga gaa atc ata gat gaa 1248
Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu
405 410 415

gaa ggt tgg ttg cac aca gga gat att ggg tat tac gat gaa gaa aaa 1296
Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys
420 425 430

cat ttc ttt atc gtg gat cgt ttg aag tct tta atc aaa tac aaa gga 1344
His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
435 440 445

tat caa gta cca cct gct gaa tta gaa tct gtt ctt ttg caa cat cca 1392
Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro
450 455 460

aat att ttt gat gcc ggc gtt gct ggc gtt cca gat cct ata gct ggt 1440
Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly
465 470 475 480

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

gag ctt ccg gga gct gtt gtt gta ctt aag aaa gga aaa tct atg act 1488

Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr

485

490

495

gaa aaa gaa gta atg gat tac gtt gct agt caa gtt tca aat gca aaa 1536

Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gin Val Ser Asn Ala Lys

500

505

510

cgt ttg cgt ggt gtc cgt ttg gtg gac gaa gta cct aaa ggt ctc 1584

Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu

515

520

525

act ggt aaa att gac ggt aaa gca att aga gaa ata ctg aag aaa cca 1632

Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro

530

535

540

gtt gct aag atg 1644

Val Ala Lys Met

545

<210> 4

<211> 548

<212> PRT

<213> Luciola lateralis

<400> 4

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro

1

5

10

15

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr

20 25 30

Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu

35 40 45

Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys

50 55 60

Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile

65 70 75 80

Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala

85 90 95

Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr

100 105 110

Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val

115 120 125

Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr

130 135 140

Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr

145 150 155 160

Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

165 170 175

Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu

180 185 190

Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys

195 200 205

Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala

210 215 220

Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu

225 230 235 240

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly

245 250 255

Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu

260 265 270

Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile

275 280 285

Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp

290 295 300

Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro

305 310 315 320

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro

325 330 335

Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile

340 345 350

Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val

355 360 365

Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Thr Leu

370 375 380

Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met

385 390 395 400

Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu

405 410 415

Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys

420 425 430

His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly

435 440 445

Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro

450 455 460

Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly

465 470 475 480

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr

485 490 495

Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys

500 505 510

Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu

515 520 525

Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro

530 535 540

Val Ala Lys Met

545

<210> 5

<211> 1644

<212> DNA

<213> Luciola lateralis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1644)

<400> 5

atg gaa aac atg gag aac gat gaa aat att gtg tat ggt cct gaa cca 48

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

1 5 10 15

ttt tac cct att gaa gag gga tct gct gga gca caa ttg cgc aag tat 96

Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr

20 25 30

atg gat cga tat gca aaa ctt gga gca att gct ttt act aac gca ctt 144

Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu

35 40 45

acc ggt gtc gat tat acg tac gcc gaa tac tta gaa aaa tca tgc tgt 192

Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys

50 55 60

cta gga gag gct tta aag aat tat ggt ttg gtt gtt gat gga aga att 240

Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile

65 70 75 80

gcg tta tgc agt gaa aac tgt gaa gaa ttc ttt att cct gta tta gcc 288

Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala

85 90 95

ggc tta ttt ata ggt gtc ggt gtg gct cca act aat gag att tac act 336

Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr

100 105 110

cta cgt gaa ttg gtt cac agt tta ggc atc tct aag cca aca att gta 384

Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val

115 120 125

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

ttt agt tct aaa aaa gga tta gat aaa gtt ata act gta caa aaa acg 432
Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr

130 135 140

gta act gct att aaa acc att gtt ata ttg gac agc aaa gtg gat tat 480
Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr

145 150 155 160

aga ggt tat caa tcc atg gac aac ttt att aaa aaa aac act cca caa 528
Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln

165 170 175

ggg ttc aaa gga tca agt ttt aaa act gta gaa gtt aac cgc aaa gaa 576
Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu

180 185 190

caa gtt gct ctt ata atg aac tct tcg ggt tca acc ggt ttg cca aaa 624
Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys

195 200 205

ggg gtg caa ctt act cat gaa aat atc gtc act aga ttt tct cac gct 672
Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Ile Val Thr Arg Phe Ser His Ala

210 215 220

aga gat cca att tat gga aac caa gtt tca cca ggc acg gct att tta 720
Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu

225 230 235 240

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

act gta gta cca ttc cat cat ggt ttt ggt atg ttt act act tta ggc 768
Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly
245 250 255

tat cta act tgt ggt ttt cgt att gtc atg tta acg aaa ttt gac gaa 816
Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu
260 265 270

gag act ttt tta aaa aca ctg caa gat tac aaa tgt tca agc gtt att 864
Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile
275 280 285

ctt gta ccg act ttg ttt gca att ctt aat aga agt gaa tta ctc gat 912
Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp
290 295 300

aaa tat gat tta tca aat tta gtt gaa att gca tct ggc gga gca cct 960
Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
305 310 315 320

tta tct aaa gaa att ggt gaa gct gtt gct aga cgt ttt aat tta ccg 1008
Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro
325 330 335

ggg gtt cgt caa ggc tat ggt tta aca gaa aca acc tct gca att att 1056
Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile
340 345 350

atc aca ccg gaa ggc gat gat aaa cca ggt gct tct ggc aaa gtt gtg 1104

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val

355

360

365

cca tta ttt aaa gca aaa gtt atc gat ctt gat act aaa aaa act ttg 1152

Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu

370

375

380

ggc ccg aac aga cgt gga gaa gtt tgt gta aag ggt cct atg ctt atg 1200

Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met

385

390

395

400

aaa ggt tat gta gat aat cca gaa gca aca aga gaa atc ata gat gaa 1248

Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu

405

410

415

gaa ggt tgg ttg cac aca gga gat att ggg tat tac gat gaa gaa aaa 1296

Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys

420

425

430

cat ttc ttt atc gtg gat cgt ttg aag tct tta atc aaa tac aaa gga 1344

His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly

435

440

445

tat caa gta cca cct gct gaa tta gaa tct gtt ctt ttg caa cat cca 1392

Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro

450

455

460

aat att ttt gat gcc ggc gtt gct ggc gtt cca gat cct ata gct ggt 1440

Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

465

470

475

480

gag ctt ccg gga gct gtt gtt gta ctt aag aaa gga aaa tct atg act 1488

Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr

485

490

495

gaa aaa gaa gta atg gat tac gtt gct agt caa gtt tca aat gca aaa 1536

Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys

500

505

510

cgt ttg cgt ggt gtc cgt ttt gtg gac gaa gta cct aaa ggt ctc 1584

Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu

515

520

525

act ggt aaa att gac ggt aaa gca att aga gaa ata ctg aag aaa cca 1632

Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro

530

535

540

gtt gct aag atg 1644

Val Ala Lys Met

545

<210> 6

<211> 548

<212> PRT

<213> Luciola lateralis

<400> 6

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro

1 5 10 15

Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg Lys Tyr

20 25 30

Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu

35 40 45

Thr Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys

50 55 60

Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile

65 70 75 80

Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala

85 90 95

Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr

100 105 110

Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val

115 120 125

Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr

130 135 140

Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr

145 150 155 160

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln

165

170

175

Gly Phe Lys Gly Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu

180

185

190

Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys

195

200

205

Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Ile Val Thr Arg Phe Ser His Ala

210

215

220

Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu

225

230

235

240

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly

245

250

255

Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu

260

265

270

Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile

275

280

285

Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp

290

295

300

Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

305 310 315 320

Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro

325 330 335

Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile

340 345 350

Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val

355 360 365

Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu

370 375 380

Gly Pro Asn Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met

385 390 395 400

Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu

405 410 415

Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys

420 425 430

His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly

435 440 445

Tyr Gln Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro

450 455 460

PCT/JP98/05864

国際様式 INTERNATIONAL FORM

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE
DEPOSIT

ISSUED PURSUANT TO Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
Identified at the bottom of this
page.

氏名(名称) キッコーマン株式会社
取締役社長 中野 孝三郎

寄託者 殿

あて名 ④ 278
千葉県野田市野田339番地

I. 微生物の表示

(寄託者が付した個別のための表示)

大腸菌 (E. coli) JM103 (pRK17-217Leu)

(受託番号)

商工研会第 3840 号

(PERM BP- 3840)

II. 科学的性質及び分類学上の位置

1種の微生物には、次の要項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
 分類学上の位置

III. 寄託及び受託

本国際寄託当局は、平成 4年 4月 22日(原寄託日)に受取した1種の微生物を受託する。

IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称: Agency of Industrial Science and Technology

所長、銘木 勲
Osamu Nakata, DIRECTOR GENERAL.あて名: 日本国茨城県つくば市1丁目1番3号(郵便番号305)
1-3, Nibashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 4年 (1992) 4月 22日

WO 99/33997

PCT/JP98/05864

Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly

465 470 475 480

Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met Thr

485 490 495

Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn Ala Lys

500 505 510

Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu

515 520 525

Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile Leu Lys Lys Pro

530 535 540

Val Ala Lys Met

545

PCT/JP98/05864

国際様式 INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE
PATENT PROCEDURE

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するデータベース登録]

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される

原寄託についての受託証

RECEIPT IN THE CASE
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
Identified at the bottom of this
page.

氏名（名称） キッコーマン株式会社
取締役社長 中野 孝三郎

寄託者 殿

あて名 ④ 278
千葉県野田市野田339番地

I. 微生物の表示

(受託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
大腸菌 (E. coli) JMI01 (PHL 7-21711a)	施工研究番第 3841 号 (PERM BP- 3841)

II. 科学的性質及び分類学上の位置

1種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 4年 4月 22日 (昭和57年5月) に受領した1種の微生物を受託する。

IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称: Agency for Natural Science and Technology
所長 鈴木 伸一郎
Osamu Suzuki, DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県水戸市駒場町1丁目1番3号 (郵便番号305)
1-3, Koma-cho, Mito-shi, Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 4年 (1992) 4月 22日

PCT/JP98/05864

国際特許
INTERNATIONAL FORM

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE INTERNATIONAL
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE
DEPOSIT

ISSUED PURSUANT to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
Identified at the bottom of this
page.

氏名（名称） キッコーマン株式会社
取締役社長 反木 文三郎
寄託者 殿
あて名 〒 278
千葉県野田市野田339番地

1. 微生物の表示

(寄託者が付した個別のたりの表示)
大腸菌 (E. coli) JM109 (pHLF11K)

(受託番号)
FERM BP- 6146

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 9年 10月 16日（原寄託日）に受領した1種の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1種の微生物を受領した。
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学科技術研究所

名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology
Akio Saito Director-General
所 在 地 倉敷市東1丁目1番3号
Dr. Saito Director-General

あて名： 日本国 天文台
1-3, Higashishiobane, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 9年 (1997) 10月 16日

PCT/JP98/05864

国際特許
INTERNATIONAL FORM

[
発明の権利上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]
]

下記国際寄託当局によって規則 7. 1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE :
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7. 1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名（名称） キッコーマン株式会社
取締役社長 茂木 友三郎
登記者 あて名 テ 278
千葉県野田市野田339番地

般

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)
大腸菌 (E. coli) JM109 (pHILfLK)

(受託番号)
FERM BP- 6147

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 9 年 10 月 16 日（原寄託日）に受領した 1 種の微生物を受託する。

4. 寄託請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に 1 種の微生物を受領した。
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Advanced Bioscience and Human-Technology
Agency of Natural Material Science and Technology



所長 大曾根 勝也 Dr. Seio Ogasaka; Director-General

あて名：日本国茨城県つくば市真一丁目1番3号（郵便番号305）
1-3, Higashib 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305; JAPAN

平成 9 年 (1997) 10 月 16 日

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/05864

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21,
C12Q1/26

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21,
C12Q1/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)、JICSTファイル (JOIS)、GeneBank/EMBL/DDBJ
(GENETYX)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 7-203995, A (東亜電波工業株式会社), 8. 8月. 1995 (08. 08. 95) 全文、第1図 (ファミリーなし)	1, 6-13
Y	JP, 6-504200, A (アマーシャム・インターナショナル・ビーエル シー), 19. 5月. 1994 (19. 05. 94) 全文、第1- 20図 & WO, 92/12253, A1 & EP, 566625, A1 & US, 5558986, A	1, 6-13
Y	W. J. Simpson et al., "The Effect of Detergents on Firefly Luciferase Reactions", Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, Vol. 6(2), 1991, p. 97-106	1, 6-13
Y	JP, 5-244942, A (キッコーマン株式会社), 24. 9月. 1993 (24. 09. 93) 全文、第1-2図 & EP, 524448, A1 & US, 5229285, A	1, 6-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に當及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
て出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理
論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 17. 03. 99	国際調査報告の発送日 30.03.99
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 富士 良宏 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3449 48 8830

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05864

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 2-171189, A (Kikkoman Corp.), 2 July, 1990 (02. 07. 90), Full text ; Figs. 1 to 8 & EP, 353464, B1	1-9
A	Hiroki Tatsumi et al., "Molecular Cloning and Expression in Escherichia Coli of a cDNA Clone Encoding Luciferase of a Firefly, <i>Luciola Lateralis</i> ", <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , Vol. 1131, 1992, p.161-165	1-9
A	Tsutomu Masuda et al., "Cloning and Sequence Analysis of cDNA for Luciferase of a Japanese Firefly, <i>Luciola Crucifera</i> ", <i>Gene</i> , Vol. 77, 1988, p.265-270	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05864

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21, C12Q1/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHEDMinimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N9/02, C12N15/63, C12N1/21, C12Q1/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

(Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), JICST File (JOIS), GeneBank/EMBL/DDBJ (GENETYX)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 7-203995, A (Toa Electronics Ltd.), 8 August, 1995 (08. 08. 95), Full text ; Fig. 1 (Family: none)	1, 6-13
Y	JP, 6-504200, A (Amersham International PLC), 19 May, 1994 (19. 05. 94), Full text ; Figs. 1 to 20 & WO, 92/12253, A1 & EP, 566625, A1 & US, 5558986, A	1, 6-13
Y	W.J. Simpson et al., "The Effect of Detergents on Firefly Luciferase Reactions", Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, Vol. 6(2), 1991, p.97-106	1, 6-13
Y	JP, 5-244942, A (Kikkoman Corp.), 24 September, 1993 (24. 09. 93), Full text ; Figs. 1, 2 & EP, 524448, A1 & US, 5229285, A	1, 6-13

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 17 March, 1999 (17. 03. 99)	Date of mailing of the international search report 30 March, 1999 (30. 03. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Faximile No.	Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/05864

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	JP. 2-171189,A (キッコーマン株式会社), 2. 7月.1990 (02.07.90) 全文、第1-8図 & EP, 353464, B1	1-9
A	Hiroki Tatsumi et al., "Molecular Cloning and Expression in Escherichia Coli of a cDNA Clone Encoding Luciferase of a Firefly, Luciola Lateralis", Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1131, 1992, p. 161-165	1-9
A	Tsutomu Masuda et al., "Cloning and Sequence Analysis of cDNA for Luciferase of a Japanese Firefly, Luciola Crucifera", Gene, Vol. 77, 1988, p. 265-270	1-9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.